

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-133391

(43)Date of publication of application : 06.06.1991

(51)Int.Cl.

C12P 21/06

(21)Application number : 01-270114

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 17.10.1989

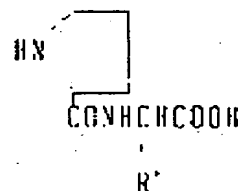
(72)Inventor : OSHIRO TAKASHI
UEJIMA TAKAYUKI

(54) PRODUCTION OF DIPEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To enzymically safely and efficiently obtain dipeptide by reacting esters of L(DL)-proline with L(DL)- α -amino acid in an aqueous medium in the presence of specific enzyme source.

CONSTITUTION: 0.05-3.0U/ml proline iminopeptidase-activating enzyme derived from *Bacillus.brevis* ATCC 8185 strain, etc., is added to an aqueous medium containing methanol, etc., at pH7-10 to obtain an enzyme solution (A). Next, 10-1000mM (B) esters of L(DL)-proline expressed by formula I [R is lower alkyl (e.g. 1-8C linear or branch group such as methyl) or aryl such as naphthyl] and 1-100mM (C) L(DL)- α -amino acid are added to the component A and subjected to condensation reaction at 15-80° C, then enzyme is deactivated at the same time of finishing of the reaction to obtain reaction-treated substance (D). Then, the component D is separated by chromatography, etc., to produce the aimed proline-containing dipeptide expressed by formula II (R' is α -amino acid residue).



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-133391

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成3年(1991)6月6日

C 12 P 21/06

8214-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

④ 発明の名称 ジペプチドの製造法

② 特 願 平1-270114

② 出 願 平1(1989)10月17日

⑦ 発 明 者 大 城 隆 東京都町田市旭町3-6-6

⑦ 発 明 者 上 島 孝 之 東京都町田市中町4-5-10

⑦ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

ジペプチドの製造法

2. 特許請求の範囲

水性媒体中、プロリンイミノペプチダーゼ活性を有する酵素源の存在下、式(I)



(式中、Rは低級アルキル基またはアリール基を表わす)

で表わされるL-またはD-L-プロリンのエステル類とL-またはD-L-α-アミノ酸とを反応させ、該水性媒体中に、式(II)



(式中、R'はα-アミノ酸残基を表わす)

で表わされる含プロリンジペプチドを生成させる

ことを特徴とするジペプチドの製造法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、プロリン含有ペプチドの製造法に関する。L-プロリル-L-フェニルアラニン、L-プロリル-L-チロシンおよびL-プロリル-L-トリプトファンなどのプロリン含有ペプチドは、血圧降下剤の構成成分としての用途が期待される。

従来の技術

プロリン含有ペプチドの製造方法には、有機化学的方法と酵素的方法がある。

有機化学的方法におけるペプチド合成は、N末端、C末端および側鎖の保護、縮合、脱保護の3つの過程が要求され、工程が複雑になっている。また反応中に、酸処理、アルカリ処理および加熱処理を伴うためラセミ化が起こる可能性もある。

有機化学的方法において保護を必要としない方法として、例えばL-プロリンにホスゲンを作用させてL-プロリンのN-カルボキシアミノ酸無

水物としたものと、L-フェニルアラニンを含むホウ酸カリウム水溶液とをpH 10.2で、0℃の温度で反応させる方法が知られている〔ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー (Journal of Organic Chemistry) 32, 3415 (1967)〕。

酵素的にプロリン含有ペプチドを合成する方法として、例えば、N-カルボベンゾキシー-L-アルギニンメチルエステルとL-プロリンアミドとにクロストリパイン (酵素番号3.4.2.2.8) を作用させてN-カルボベンゾキシー-L-アルギニル-L-プロリンアミドを合成する方法が知られている〔バイオテクノロジー・レターズ (Biotechnology Letters) 8, 873 (1986)〕。

発明が解決しようとする課題

有機化学的方法におけるペプチド合成で、保護を必要としない方法は、N-カルボキシアミノ酸無水物を合成する際、極めて毒性の高いホスゲンを使うため、危険な合成法である。

また、酵素的方法におけるペプチド合成で用いられるクロストリパインは、嫌気性細菌であるク

ロストリジウム属由来のため調製が困難な点と、両方の基質がいずれも保護アミノ酸で、しかも生成物の脱保護も必要であるという点で実用的な方法であるとは言い難い。

課題を解決するための手段

本発明者らは、プロリン含有ペプチドの製造法について、鋭意検討した結果、N末端がプロリンであるペプチド鎖からN末端のプロリンを特異的に除去できるプロリンイミノペプチダーゼ (酵素番号3.4.11.5) の存在下プロリンのエステル類とアミノ酸とを反応させた際に、基質であるプロリンのエステル類のイミノ基、またこれに作用するアミノ酸のカルボキシル基および側鎖の官能基を保護する必要がなく縮合反応を行うことができ、かつ反応条件が中性かつ常温常圧であることよりラセミ化が起こる可能性が少ないプロリルアミノ酸で表わされるジペプチドが合成できることを見出し、本発明を完成した。

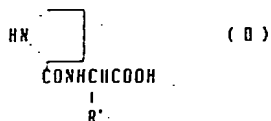
すなわち、本発明は、水性媒体中、プロリンイミノペプチダーゼ活性を有する酵素源の存在下式

(I)



(式中、Rは低級アルキル基またはアリール基を表わす)

で表わされるL-またはD-プロリンのエステル類とL-またはD-α-アミノ酸とを反応させ、該水性媒体中に、式(II)



(式中、R'はα-アミノ酸残基を表わす)

で表わされる含プロリンジペプチドを生成させることを特徴とするジペプチドの製造法を提供する。

式(I)のRの定義中、低級アルキル基としては、炭素数1~8の直鎖または分岐状のアルキル、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネ

オペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチルおよびn-オクチルなどの基があげられる。アリール基としては、フェニル、ナフチルなどの基があげられる。

式(II)のR'の定義中、α-アミノ酸残基にいうアミノ酸としては、いかなるアミノ酸も含まれる。

本発明に用いるプロリンイミノペプチダーゼ活性を有する酵素源としては、ペプチド鎖のN末端に存在するプロリンをそのペプチド鎖から遊離させる触媒作用を有する限り、とくに制限されるものではなく、該酵素の精製標品、同粗精製標品、該酵素含有物、例えば該酵素活性を有する微生物の菌体または菌体処理物などいずれも用いることができる。

例えば、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) ATCC8185、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) ATCC9999、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) FERM P-5242 (特公昭62-51591号公報)、ビフィドバクテリウム・インファンテリス (Bifidobacterium

infantis) ATCC15697などの微生物が生産する酵素や高等動物の肝臓由来または植物由来の酵素などを用いることができる。

固体処理物としては、例えばアルギン酸などの担体に固定化したもの、凍結乾燥菌体、細胞膜を破壊して得られた粗抽出液、あるいはこの抽出液を上記と同様に固定化したもの、またこの粗抽出液を塩析、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどの手段により精製したもの、さらにはこの精製標品を上記の様に固定化したものなどがあげられる。また、遺伝子のクローニングにより得られる高発現プラスミドを有する組換え株、あるいはその生産する高力価酵素を利用することはさらに好ましい。

本発明のプロリンのエステル類とアミノ酸との縮合反応は、水またはリン酸緩衝液またはトリス塩酸緩衝液などの緩衝液、あるいはメタノール、エタノール、ジメチルホルムアミドなどを含有する水性媒体中で、pH 7~10、好ましくはpH

8~9で、15~80℃、好ましくは25~60℃の温度で行う。プロリンのエステル類は反応液に対して、10~1000mM、好ましくは100~500mMの濃度で用いられる。各種アミノ酸は反応液に対して1~100mM、好ましくは5~50mMの濃度で用いられる。

プロリンイミノペプチダーゼは、抽出酵素を使う場合、0.05~3.0U/㎖、好ましくは0.2~2.0U/㎖加え、直接微生物菌体を使う場合には、0.1~10% (湿重量) 菌体濃度で反応させる。ここで、プロリンイミノペプチダーゼの酵素活性は、30℃、50mMのトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) 中で、1分間にプロリンパラニトロアニリドより1μmoleのプロリンを遊離させる力価を1単位 (IU) として表わす。

縮合反応において、反応時間が長くなると生成物であるジペプチドの加水分解が起こるので好ましくない。従って、縮合反応終了と同時に反応液から菌体およびその処理物を除去するか、加熱処理 (約100℃) などにより酵素を失活させて反

応を停止させ、生成したジペプチドの加水分解を極力抑えることが必要である。

L-プロリル-L-アミノ酸で表わされるジペプチドの合成反応が終了した時点で速やかに反応を停止させ、反応液より目的物質であるジペプチドと未反応基質であるプロリンメチルエステルおよびL-アミノ酸とをそれぞれ分離回収する。この分離回収は、公知の吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、溶媒抽出、分別晶析などの方法で行うことができる。

以下に実施例を示す。

実施例1

L-プロリンメチルエステル200mMとL-フェニルアラニン25mMを含むpH8.0の反応液に、プロリンイミノペプチダーゼを1.2U/㎖となるように添加し、全量を100㎖として30℃で振盪しながら反応を行った。40分間反応後、反応液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析したところプロリルフェニルアラニン18

mMの生成が認められた。この反応液を加熱処理

(100℃、3分間) し、変性タンパクを遠心分離で除去した後、まずシリカゲルカラムクロマトグラフィーでプロリンメチルエステルを取り除き、ついで逆相HPLCを用いて目的物質プロリルフェニルアラニンとフェニルアラニンとを分離した。この結果、L-プロリル-L-フェニルアラニンを1.44mM得た。

実施例2

L-フェニルアラニン25mMの代わりにD-L-フェニルアラニン25mMを用いる以外は実施例1と同様に行って、L-プロリル-L-フェニルアラニンを0.72mM得た。

実施例3

L-フェニルアラニン25mMの代わりにL-チロシン25mMを用いる以外は実施例1と同様に行って、L-プロリル-L-チロシンを1.38mM得た。

実施例4

L-フェニルアラニン25mMの代わりにL-ト

特開平3-133391(4)

手続補正書(自発)

平成11年12月27日

33

特許庁長官殿

リプトファン25mMを用いる以外は実施例1と同様に行って、L-プロリン-L-トリプトファンを1.88mM得た。

実施例5

L-プロリンメチルエステル200mMの代わりにD-L-プロリンメチルエステル200mMを用いる以外は実施例1と同様に行って、L-プロリン-L-フェニルアラニンを0.68mM得た。

発明の効果

本発明により効率のよいプロリン含有ペプチドの酵素的製造法が提供される。

特許出願人 (102)協和醗酵工業株式会社

代表者 加藤 幹 夫



1. 事件の表示

平成11年特許願第270114号

2. 発明の名称

ジペプチドの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名称 (102) 協和醗酵工業株式会社

(TEL: 03-282-0036)

代表者 加藤 幹 夫



4. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

5. 補正の内容

- (1) 明細書第10頁8行目の「1.44mM」を「1.44mmol」に訂正する。

方式
審査

33

特許庁

1.12.28

- (2) 同書中、第10頁13行目の「0.72mM」を「0.72mmol」に訂正する。

- (3) 同書中、第10頁下から4行目の「1.38mM」を「1.38mmol」に訂正する。

- (4) 同書中、第11頁3行目の「1.88mM」を「1.88mmol」に訂正する。

- (5) 同書中、第11頁8行目の「0.68mM」を「0.68mmol」に訂正する。